

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/000694

International filing date: 21 January 2005 (21.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES
Number: P200400121
Filing date: 21 January 2004 (21.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 03 June 2005 (03.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE DE INVENCION número 200400121 , que tiene fecha de presentación en este Organismo el 21 de Enero de 2004.

Madrid, 10 de Febrero de 2005

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica

P.D.

ANA Mª REDONDO MÍNGUEZ





MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200400121

4 ENE 21 11:26

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

CÓDIGO

MADRID

28

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

CONSEJO SUP. INVESTIG. CIENTÍFICAS

BIONOSTRA, S.L.

NOMBRE

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

CÓDIGO PAÍS

ES

DNI/CIF

Q2818002D

CNAE

PYME

ESPAÑOLA

ES

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO SERRANO, 117

LOCALIDAD MADRID

PROVINCIA MADRID

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELÉFONO 91 5855000

FAX 91 5855287

CORREO ELECTRÓNICO ott@csic.es

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

RODRÍGUEZ AGUIRRE

RUIZ CASTÓN

GONZÁLEZ DE LLANO

NOMBRE

JOSE FCO

JOSÉ

Mª DOLORES

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

CÓDIGO

PAÍS

ES

ES

ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO

PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS:

☒ Nº DE REIVINDICACIONES:

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS:

☒ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS:

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☒ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: AUTORIZACIÓN

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

Domingo Repun

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

MOD. 3101 - 1 - EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400121

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

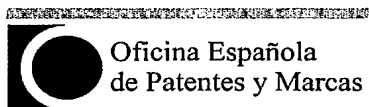
Las cápsidas vacías del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV), VLP(-VP4), se caracterizan porque están constituidas, únicamente, por ensamblaje de proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV. Dichas cápsidas tienen actividad inmunogénica y pueden ser utilizadas en la elaboración de vacunas para proteger animales de la infección causada por IBDV así como en la elaboración de vectores para terapia génica.

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400121

FECHA DE PRESENTACIÓN

☐ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:

APELLIDOS O
DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO
PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

(7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

OÑA BLANCO

ABAITUA ELUSTONDO

LUQUE BUZO

RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA

ANA M^a

FERNANDO

DANIEL

JUAN RAMÓN

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:

LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA

PAÍS DE ORIGEN



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21 NÚMERO DE SOLICITUD

31 NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAÍS

22 FECHA DE PRESENTACIÓN

62 PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

71 SOLICITANTE (S)

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
BIONOSTRA, S.L.**

DOMICILIO **SERRANO, 117 - 28006 MADRID**

NACIONALIDAD **ESPAÑOLA**

72 INVENTOR (ES) **José Francisco Rodríguez Aguirre, José Ruiz Castón, M^a Dolores González de Llano, Ana M^a Oña Blanco, Fernando Abaitua Elustondo, Daniel Luque Buzo y Juan Ramón Rodríguez Fernández-Alba**

51 Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54 TÍTULO DE LA INVENCION

**CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA
ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU
PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES**

57 RESUMEN

**CCÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV),
SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES**

Las cápsidas vacías del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV), VLP(-VP4), se caracterizan porque están constituidas, únicamente, por ensamblaje de proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV. Dichas cápsidas tienen actividad inmunogénica y pueden ser utilizadas en la elaboración de vacunas para proteger animales de la infección causada por IBDV así como en la elaboración de vectores para terapia génica

CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a cápsidas virales vacías del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV), con actividad inmunogénica frente a IBDV, constituidas por las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, a su producción mediante ingeniería genética y a sus aplicaciones, en particular, en la elaboración de vacunas frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa causada por IBDV y en la elaboración de vectores para terapia génica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), también conocida como enfermedad de Gumboro, pertenece a la familia Birnaviridae, infecta distintas especies aviares y es el responsable directo de una grave enfermedad inmunosupresora causante de importantes pérdidas económicas en la industria avícola mundial.

Las partículas de IBDV son icosaédricas, con una simetría T=13, carecen de envuelta y están formadas por una única capa proteica. Hasta el momento, las aproximaciones encaminadas a la obtención un modelo atómico para las partículas de IBDV han fracasado. Por ello, la información estructural disponible está basada en modelos tridimensionales generados a partir de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica del virus purificado y de VLPs. En base a esos estudios, se ha comprobado que la superficie externa de la partícula está formada por un entramado continuo de 260 trímeros de la proteína VP2 (37 kDa) ordenados en cinco conformaciones diferentes. La cara interna de las partículas contiene 200 trímeros de la proteína VP3 (29 kDa), estos últimos, independientes entre sí, se encuentran unidos a la zona basal de los trímeros de VP2. Se ha sugerido que un tercer polipéptido, VP4 (28 kDa), también podría formar parte de las partículas, estando situado en la base de los pentámeros que forman los vértices de la estructura icosaédrica.

Los polipéptidos VP2, VP3 y VP4 se producen a partir del procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor de un tamaño de 109 kDa. Este precursor se

procesa auto-catalíticamente liberando los polipéptidos pVP2 (48 kDa), VP3 y VP4. El dominio VP4, que se localiza en la región central de la poliproteína, pertenece a la familia de las proteasas Lon y es el responsable del corte proteolítico. Los polipéptidos pVP2 y VP3 son los responsables directos del ensamblaje de las cápsidas. El producto

5 pVP2 sufre un último corte en su extremo C-terminal antes de dar lugar a la forma madura de la proteína, VP2, que es la que se encuentra en las partículas purificadas (Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. & Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *Journal of Virology* 76:2393-

10 2402). Este procesamiento de pVP2 es necesario para la correcta formación de las cápsidas y requiere de la presencia de VP3, aunque la proteasa responsable aún no ha sido identificada (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical

15 role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49).

Las vacunas convecionales empleadas para el control de la bursitis infecciosa se basan en el empleo de cepas, con diferentes grados de virulencia, del propio IBDV crecidas en cultivo celular o en huevos embrionados. Los extractos que contienen el material infeccioso son sometidos a procesos de inactivación química para producir

20 vacunas inactivadas o bien son empleados de forma directa para producir vacunas vivas atenuadas (Sharma, J. M., Kim, I. J., Rautenschlein, S. & Yeh, H. Y. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology* 24:223-235; van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G. 2000. *Rev Sci Tech* 2000, 19:509-543). Este último tipo de vacunas

25 presenta los inconvenientes clásicos asociados con el empleo de vacunas vivas atenuadas, concretamente, el riesgo de mutaciones que reviertan la virulencia del virus o le hagan perder su inmunogenicidad.

Se han descrito vacunas sub-unidad recombinantes que contienen la proteína VP2 de IBDV expresada en diversos sistemas de expresión, por ejemplo, bacterias,

30 levaduras o baculovirus, normalmente en forma de proteína de fusión. Los resultados obtenidos en ensayos de inmunización de pollos con dichas vacunas no han sido completamente satisfactorios.

Las cápsidas virales vacías o partículas pseudovirales (VLPs, del inglés “virus-like particles”), constituyen una alternativa al empleo de vacunas vivas atenuadas y de vacunas sub-unidad recombinantes. Las VLPs se obtienen por autoensamblaje de las sub-unidades constituyentes de la cápsida viral y mimetizan la estructura y propiedades antigénicas del virión nativo aunque carecen de material genético por lo que son incapaces de replicarse. Además de su aplicación con fines vacunales las VLPs pueden ser utilizadas como vectores de moléculas de interés biológico, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos o proteínas. A modo ilustrativo pueden citarse VLPs de parvovirus (US 6.458.362) o del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (US 6.602.705).

La morfogénesis es un proceso vital para el ciclo vírico que requiere de pasos sucesivos asociados a modificaciones en los polipéptidos precursores. Por ello, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, utilizada con frecuencia por virus icosaédricos, es la utilización de polipéptidos provenientes de una única poliproteína como base de sus componentes estructurales. En estos casos, el adecuado procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de ensamblaje.

En trabajos previos se ha demostrado este principio para el ensamblaje de las cápsidas de IBDV (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). La expresión en células eucarióticas del gen codificador para la poliproteína de IBDV da lugar a la formación de VLPs totalmente indistinguibles morfológica y bioquímicamente de los viriones de IBDV. Asimismo, se ha comprobado que el ensamblaje de las cápsidas necesita únicamente de la síntesis y del correcto procesamiento de la poliproteína viral y es independiente de la presencia del genoma vírico o de otras proteínas codificadas por el genoma viral tales como VP5 y VP1.

Paralelamente a la formación de cápsidas, el producto VP4 de IBDV es capaz de autoensamblarse en estructuras tubulares de 20 nm de diámetro. Estos túbulos, conocidos como túbulos de tipo II, se co-purifican parcialmente con las partículas virales. Otros experimentos han demostrado que la obtención de VLPs de IBDV, utilizando para la expresión de la poliproteína baculovirus recombinantes (rBVs), es extremadamente ineficiente obteniéndose como resultado la acumulación de grandes

- cantidades de túbulos de tipo I en el citosol de las células infectadas (Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278:322-331; Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. & Delmas, B. (2002). The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *Journal of Virology* 76:2384-2392). Recientemente se ha demostrado que esto es debido al corte proteolítico a que es sometida la proteína VP3 cuando es sintetizada en células de insecto. Dicha proteólisis se previene casi totalmente por la formación de complejos VP3/VP1 (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-6449).

Por tanto, los resultados obtenidos hasta la fecha a partir de la expresión de los genes de IBDV en distintos sistemas recombinantes ha permitido concluir que: (i) el proceso de ensamblaje es independiente de la presencia del material genético del virus, (ii) para el ensamblaje sólo son necesarios los polipéptidos codificados por el gen de la poliproteína, y (iii) el ensamblaje requiere de una interacción coordinada entre los péptidos pVP2 y VP3.

Sin embargo, no se conoce si la interacción pVP2/VP3 se establece entre dominios de VP2 y VP3 de la poliproteína precursora cuando aún no ha sufrido modificaciones, o si por el contrario, esta interacción ocurre tras el procesamiento del precursor. Además, la información actual no excluye la posibilidad de que VP4 pudiera jugar un papel relevante en la morfogénesis de la cápsida viral. De hecho, se han descrito VLPs de IBDV formadas por ensamblaje de las proteínas VP2, VP3 y VP4 de IBDV (US 6.528.063, US 5.788.970 y JP 5194597).

Por otro lado, la información acerca de la expresión de proteínas de IBDV mediante ingeniería genética en distintos modelos celulares es escasa. Se ha descrito la expresión de proteínas de IBDV en células de insecto, bacterias y levaduras. Jagadish et al. (Jagadish MN, Vaughan PR, Irving RA, Azad AA, Macreadie IG. (1990). Expression and characterization of infectious bursal disease virus polyprotein in yeast. *Gene* 9:179-186; Macreadie IG, Vaughan PR, Chapman AJ, McKern NM, Jagadish MN, Heine HG, Ward CW, Fahey KJ, Azad AA. (1990). Passive protection against

infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. *Vaccine* 8:549-552) describen la expresión de VP2 de IBDV en levaduras. Los resultados descritos indican que la expresión de la poliproteína viral en 2 especies de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*, es muy ineficiente, acumulándose una gran variedad de productos proteicos de diferente masa molecular. El fracaso en la obtención de productos proteicos del tamaño esperado y la imposibilidad de detectar estructuras producidas por el ensamblaje de éstas fue atribuido a dos posibles causas: (i) una posible toxicidad de la proteasa de IBDV (VP4) en este sistema; y/o (ii) la ineficiencia del sistema de expresión para llevar a cabo una transcripción y/o traducción correcta de la poliproteína de IBDV. Recientemente, Pitcovski et al. (Pitcovski J., Gutter B, Gallili G, Goldway M, Perelman B, Gross G, Krispel S, Barbakov M, Michael A. (2003). *Vaccine* 21:4736-4743) han descrito la expresión de VP2 de IBDV en *Pichia pastoris* y la inmunización de pollos con un material que comprende la proteína recombinante (rVP2) en forma parcialmente purificada. En ningún caso se ha descrito la obtención en levaduras de VLPs de IBDV.

Un trabajo previo desarrollado por los inventores ha permitido establecer sistemas para la obtención de VLPs de IBDV empleando diferentes vectores de expresión eucariótica. Estos vectores han sido utilizados para la expresión de la poliproteína de IBDV en ausencia o presencia de la RNA polimerasa viral VP1. La caracterización bioquímica de las VLPs purificadas demuestra que contienen las proteínas pVP2, VP2 y VP3, cuando se expresa únicamente la poliproteína viral y las proteínas pVP2, VP2, VP3 y VP1 cuando se realiza la expresión simultánea de la poliproteína y la RNA polimerasa viral (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79: 1047-1054; Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278: 322-331; Maraver, A., et al., (2003) citado *supra*; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal*

of Virology 73: 6973-6983). Sin embargo, no se han descrito previamente VLPs basadas únicamente en pVP2 y VP3 de IBDV, ni su potencial uso con fines vacunales o como vehiculizadoras de productos biológicos de interés.

5 COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevas vacunas eficaces y seguras frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV).

La solución proporcionada por esta invención se basa en que es posible obtener VLPs de IBDV correctamente ensambladas mediante la expresión simultánea de los polipéptidos pVP2 y VP3 de IBDV como genes independientes y como única representación de las proteínas de IBDV en un sistema de expresión génica. Dichas VLPs están formadas por autoensamblaje de, únicamente, pVP2 y VP3 de IBDV, por lo que carecen de VP4 de IBDV, y, por ese motivo, se denominan VLP(-VP4) (singular) o VLPs(-VP4) (plural) en esta descripción. Dichas VLPs(-VP4) pueden ser utilizadas, por ejemplo, con fines terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, en la elaboración de vacunas para proteger aves de la infección causada por IBDV o en la elaboración de vectores para terapia génica.

Los resultados obtenidos permiten concebir dos nuevas conclusiones al entendimiento del patrón de ensamblaje del IBDV: (i) las interacciones entre los polipéptidos pVP2/VP3 dan como resultado un ensamblaje eficiente de las partículas de IBDV sin necesidad de la expresión de la poliproteína completa, y (ii) el polipéptido VP4 no es necesario para la formación de la cápsida.

Estos resultados han permitido diseñar una nueva estrategia o procedimiento para la producción eficiente de VLPs de IBDV que contienen los elementos proteicos antigénicamente relevantes para inducir una respuesta inmune. Esta estrategia se basa en la utilización de un sistema o vector de expresión génica que permite la coexpresión de los polipéptidos pVP2 y VP3 como genes independientes y que evita la síntesis de la poliproteína precursora de dichos polipéptidos así como la presencia del polipéptido VP4 durante el proceso de ensamblaje de las cápsidas virales vacías.

En una realización particular, se describe la expresión y obtención de VLPs de IBDV, en particular, VLPs(-VP4), en células de insecto mientras que en otra realización particular dichas VLPs(-VP4) se obtienen en levaduras, con un rendimiento muy elevado y con un coste económico muy bajo.

Las vacunas obtenidas utilizando dichas VLPs(-VP4) presentan numerosas ventajas ya que, por una parte, se evita la manipulación de material altamente infeccioso, se previene el riesgo potencial de aparición de nuevos mutantes de IBDV y se elimina el uso de virus vivo en las explotaciones avícolas, previniéndose de este modo el riesgo de diseminación de cepas vacunales de IBDV al Medio Ambiente, y, por otra parte, permite el desarrollo de sistemas de diagnóstico diferencial para discriminar entre animales vacunados e infectados. Estos sistemas de diagnóstico se basan en la detección de anticuerpos frente a las proteínas VP2 y VP4. Los animales con IBDV desarrollan una fuerte respuesta humoral frente a ambas proteínas. Mientras que los animales inmunizados con VLPs(-VP4) solo presentan anticuerpos frente a la proteína VP2.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención lo constituye una cápsida viral vacía de IBDV, VLP(-VP4), con actividad inmunogénica frente a la infección en IBDV, caracterizada porque está constituida por autoensamblaje de, únicamente, las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV.

Un aspecto adicional de esta invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV proporcionadas por esta invención, basado en la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV como dos genes independientes.

Los ácidos nucleicos, construcciones génicas, sistemas de expresión y células huésped desarrollados para la puesta en práctica de dicho procedimiento de producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, así como su empleo para la producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Dichas VLPs(-VP4) de IBDV tienen la capacidad de inmunizar animales, en particular, aves, frente a la enfermedad aviar causada por el IBDV así como la capacidad de vectorizar o vehiculizar moléculas de interés biológico, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. En una realización particular, dichas VLPs(-VP4) de IBDV pueden ser utilizadas en la elaboración de una vacuna para proteger aves frente al virus causante de la enfermedad aviar conocida como bursitis infecciosa (IBDV). Prácticamente cualquier ave, preferentemente aquellas especies aviares de interés económico, por ejemplo, pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices, avestruces, etc., pueden ser inmunizadas frente a la infección causada por IBDV con las vacunas proporcionadas por esta invención. En otra realización particular,

dichas VLPs(-VP4) de IBDV pueden vehiculizar, en su interior, productos con actividad biológica, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de vectores para terapia génica.

Por tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el empleo de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, en la elaboración de medicamentos, tales como vacunas y vectores para terapia génica. Dichas vacunas y vectores constituyen aspectos adicionales de la presente invención. En una realización particular, dicha vacuna es una vacuna útil para proteger aves de la infección causada por IBDV. En una realización concreta, dichas aves seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces, preferentemente, pollos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. (a) El diagrama esquematiza los pasos de procesamiento proteolítico necesarios para la formación de las proteínas maduras de la cápsida VP2 y VP3 a partir de la poliproteína precursora. (b) El diagrama refleja las diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV descritas hasta el momento, así como las estructuras producidas mediante su expresión en diferentes sistemas heterólogos. Los números indican la posición correspondiente al primer y último residuo aminoacídico de la poliproteína presente en cada una de las construcciones. La parte inferior de la figura muestra imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las estructuras obtenidas mediante expresión de las diferentes construcciones. La barra corresponde a 50 nm. Los datos han sido tomados de las siguientes referencias: Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*; Maraver *et al.*, (2003), citado *supra*; Martínez-Torrecuadrada *et al.*, (2000), citado *supra*; Castón *et al.*, 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. *Journal of Virology* 75, 10815-10828.

Figura 2. Análisis microscópico de células de insecto H5 que coexpresan pVP2 y VP3. La distribución subcelular de las proteínas pVP2 y VP3 fue analizada mediante inmunomicroscopía confocal. Células infectadas con los rBVs FB/pVP2 (a), FB/VP3 (b), o FBD/pVP2-VP3 (c-e) fueron incubadas con suero de conejo anti-pVP2 y suero de rata anti-VP3. A continuación, las células fueron incubadas con suero de cabra anti-Ig de conejo acoplada a Alexa 488 (rojo) y con suero de cabra anti-Ig de rata

acoplada a Alexa 594 (verde). Los núcleos se tiñeron con To-Pro 3 (azul). (e) Superposición de las imágenes mostradas en los paneles (c) y (d). Imágenes de microscopía electrónica correspondientes a secciones de células H5 infectadas con diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV. (f) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con virus FB parental. El inserto corresponde a un detalle ampliado del área indicada por el recuadro. (g) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVP2-VP3. El inserto corresponde a un detalle ampliado del área indicada por el recuadro. (h) Imagen de alta magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVP2-VP3 que muestra en detalle la formación de estructuras de IBDV. (i) Imagen de alta magnificación de una célula BSC1 infectada con el virus vacunal recombinante VTLacOI/POLY mostrando estructuras similares a las detectadas en el panel (h). Las barras indican 600 nm (paneles f y g) y 200 nm (paneles h e i).

Figura 3. Caracterización estructural y bioquímica de las estructuras derivadas de IBDV producidas en células de insecto co-infectadas con los baculovirus recombinantes (rBV) FB/pVP2 + FB/his-VP3. Células co-infectadas con los rBV FB/pVP2 y FB/his-VP3, o infectadas con el virus FBD/Poly-VP1 o FB/pVP2 fueron empleadas para purificar estructuras derivadas de IBDV mediante centrifugación en gradientes de sacarosa. Los paneles (a), (b), y (c) muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la fracción 4 de los gradientes obtenidos a partir de las infecciones con FBD/Poly-VP1, FB/pVP2+FB/his-VP3, y FB/pVP2, respectivamente. El panel (d) muestra los resultados de un análisis mediante Western blot de los gradientes de sacarosa correspondientes a cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 y FB/pVP2+FB/his-VP3, respectivamente. Los extractos totales (input) y las diferentes fracciones de los gradientes de sacarosa (la fracción F1 corresponde al fondo del gradiente) fueron analizadas mediante Western blot empleando sueros específicos frente a las proteínas VP1, pVP2, VP3, y VP4 de IBDV, respectivamente. Se indica la masa molecular en kDa de los polipéptidos inmunoreactivos.

Figura 4. Caracterización bioquímica y estructural de VLPs de IBDV producidas en *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP. Un cultivo de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP fue crecido a 30°C en medio suplementado con el inductor galactosa. A las 18 h el cultivo fue recogido y centrifugado. El sedimento resultante fue procesado mediante

fraccionamiento en un gradiente lineal 25-50% de sacarosa. A) Análisis bioquímico de muestras correspondientes al sedimento antes de fraccionar (T) así como de las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y western blot empleando anticuerpos específicos frente a las proteínas VP3 (anti-VP3) y pVP2 (anti-pVP2). Las flechas indican las posiciones de las bandas inmunoreactivas correspondientes a las proteínas VP3-GFP (61 kDa) y pVP2 (48 kDa), respectivamente. B) El análisis estructural de las muestras obtenidas fue realizado mediante TEM. La imagen corresponde a una micrografía obtenida a partir de una alícuota correspondiente a la mezcla de las fracciones 7, 8 y 9 del gradiente de sacarosa. La muestra fue teñida con acetato de uranilo y observada mediante TEM. La barra corresponde a 65 nm. C) Muestra de VLPs obtenidas mediante la expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero mediante infección con el virus vacunal recombinante VT7/Poly (Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*). La barra corresponde a 65 nm.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención proporciona una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), en adelante VLP(-VP4) de la invención, caracterizada porque está constituida por ensamblaje de, únicamente, proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV.

El término "IBDV", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de IBDV pertenecientes a cualquiera de los serotipos (1 ó 2) conocidos [a título ilustrativo véase la revisión realizada por van den Berg TP, Eterradosi N, Toquin D, Meulemans G., en *Rev Sci Tech* 2000 19: 509-43] y los términos "proteína pVP2 de IBDV" y "proteína VP3 de IBDV" se refieren a las diferentes formas de las proteínas pVP2 y VP3 representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Sánchez y Rodríguez (1999) (Sánchez AB, Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. 1999 Sep 15; 262(1):190-199) así como proteínas sustancialmente homólogas a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos

un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

La proteína pVP2 de IBDV presente en la VLP(-VP4) de la invención puede ser cualquier proteína pVP2 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la
5 proteína pVP2, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136]

La proteína de VP3 de IBDV presente en la VLP(-VP4) de la invención puede ser cualquier proteína VP3 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la proteína VP3, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso
10 AAD30136].

En una realización particular, las VLPs(-VP4) de la invención presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de las VLPs de IBDV obtenidas en otros sistemas de expresión (Figura 4C).

Las VLPs(-VP4) de la invención pueden obtenerse mediante la expresión
15 simultánea de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, en células huésped apropiadas. Dichas células huésped apropiadas son células que contienen la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas. En una realización particular, dichas células huésped
20 apropiadas son células transformadas, transfectadas o infectadas con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que
25 comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha
30 proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, en forma de 2 genes independientes. De forma más concreta, el ácido nucleico proporcionado por esta invención se caracteriza porque su secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase

de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV. Una característica del ácido nucleico proporcionado por esta invención es que carece de la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP4 de IBDV. Tal como se utiliza en esta descripción, el término “fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2” o “fase de lectura abierta correspondiente a la proteínas VP3 de IBDV” incluye, además de las secuencias de nucleótidos de dichas fases de lectura abierta, otras fases de lectura abiertas análogas a las mismas codificantes de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV. El término “análogo/a”, tal como aquí se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de pVP2 y VP3 de IBDV, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos, un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción génica que comprende un ácido nucleico proporcionado por esta invención, es decir, un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV. Dicha construcción génica carece de la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP4 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión seleccionado entre:

- 5 a) un sistema de expresión que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV; y
- 10 b) un sistema de expresión que comprende dos construcciones génicas, una primera construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y una segunda construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, operativamente unida a unos
- 15 elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En una realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, en donde dicha construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

25 En otra realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende (i) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y (ii) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control

30 de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes en el sistema de expresión proporcionado por esta invención incluyen promotores, que dirigen la transcripción de las secuencias de nucleótidos de interés a las que están operativamente enlazados, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc.

Prácticamente cualquier sistema o vector de expresión apropiado puede ser utilizado en la generación del sistema de expresión proporcionado por esta invención. A modo ilustrativo, dichos sistemas o vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, además, un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano o de levadura para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. En una realización particular, dicho sistema o vector de expresión es un plásmido, tal como un plásmido adecuado para transformar levaduras, por ejemplo, el plásmido denominado pESCURA/pVP2-VP3-GFP (Ejemplo 2), o un virus, tal como un baculovirus recombinante (rBV), por ejemplo, el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2), que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas (pVP2 de IBDV e his-VP3) simultáneamente en células de insecto, o los rBVs denominados FB/pVP2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1) que expresan las proteínas pVP2 de IBDV e his-VP3, respectivamente, cuando co-infectan células de insecto, obteniéndose VLPs(-VP4) de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que contiene la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción

génica o bien en dos construcciones génicas diferentes. En una realización particular, dicha célula huésped es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con (i) un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende bien una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con (ii) un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y otra construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV.

En una realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, en donde dicha construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otra realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y con una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

Prácticamente cualquier célula huésped susceptible de ser transformada, transfectada o infectada por un sistema de expresión proporcionado por esta invención puede ser utilizada, por ejemplo, células de mamífero, células aviares, células de insecto, levaduras, etc.; no obstante, en una realización particular, dicha célula huésped se selecciona entre levaduras y células de insecto. Las levaduras son adecuadas por razones

de simplicidad y coste de producción. Las células de insecto son adecuadas cuando el sistema de expresión comprende uno o dos baculovirus recombinantes (rBV). El empleo de rBV es ventajoso por cuestiones de bioseguridad relacionadas con el rango de huésped de los baculovirus, incapaces de replicar en otros tipos celulares que no sean de insecto.

5 En una realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, etc., transformada con un sistema de expresión, tal como un plásmido o un vector de expresión, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia
10 de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, infectada con un sistema de expresión, tal como un baculovirus recombinante, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha
15 proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, co-infectada con un sistema de expresión que comprende un primer baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada
20 por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y con un segundo baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de
25 VLPs(-VP4) de la invención que comprende cultivar una célula huésped proporcionada por esta invención que contiene la secuencia de nucleótidos codificantes de dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de dicha proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes, y que expresa simultáneamente dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, si se desea,
30 recuperar dichas VLPs(-VP4) de la invención. En una realización particular, dicha célula huésped proporcionada por esta invención es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la

secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV.

Dicho procedimiento comprende, por tanto, la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV como dos genes independientes. Tras la expresión simultánea de dichas proteínas (pVP2 y VP3 de IBDV) en dichas células, las proteínas expresadas se ensamblan y forman las VLPs(-VP4) de la invención, las cuales pueden ser aisladas o retiradas del medio, y, si se desea, purificadas. El aislamiento y purificación de dichas VLPs(-VP4) de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

En una realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se realiza mediante el empleo de un rBV que permite la expresión simultánea de dichas proteínas a partir de dos genes quiméricos independientes en células de insecto. En este caso, la producción de VLPs(-VP4) de la invención puede realizarse mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un rBV que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, tal como el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2) o bien, alternativamente, la obtención de un rBV que contiene una construcción genica que codifica para la proteína pVP2 de IBDV y la obtención de otro rBV que contiene una construcción génica que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, tales como los rBVs denominados FB/pPV2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1), seguido de la infección de células de insecto con dicho sistema de expresión basado en dicho(s) baculovirus recombinante(s), expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las VLPs(-VP4) de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas VLPs(-VP4) de la invención.

La construcción de un baculovirus recombinante que permite la expresión de forma independiente de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS, Lee SC, Olins PO. 1995. A novel

host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. Gene 160: 191-4; Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. J Virol 67: 4566-79).

En otra realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se realiza mediante el empleo de un vector que permite la expresión de dichas proteínas en células de levadura. En este caso, la producción de VLPs(-VP4) de la invención puede llevarse a cabo mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un plásmido que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, seguido de la transformación de levaduras con dicho sistema de expresión, expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las VLPs(-VP4) de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas VLPs(-VP4) de la invención. En una realización concreta, el sistema de expresión adecuado para transformar levaduras está basado en un sistema de expresión pESC Yeast (Stratagene) tal como, por ejemplo, el plásmido pESCURA/pVP2/VP3-GFP (Ejemplo 2) que contiene una construcción génica que codifica para las proteínas pVP2 de IBDV y VP3-GFP.

La obtención de levaduras transformadas con una construcción génica o con un sistema o vector de expresión apropiado que permite la expresión simultánea de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (pESC epitope tagging vectors Instructions manual. Stratagene www.stratagene.com; Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory).

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del sistema de expresión génica proporcionado por esta invención para la producción y obtención de VLPs(-VP4) de la invención.

Las VLPs(-VP4) de la invención pueden ser utilizadas para inmunizar animales, en particular, aves, *per se* o como vectores o vehiculizadores de moléculas con actividad biológica, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico. En una realización

particular, dichas moléculas con actividad biológica incluyen antígenos o inductores de respuestas inmune en animales o humanos a los que se suministre, o bien fármacos que se liberan en su sitio de acción específico, o bien secuencias de ácido nucleico, todas ellas útiles en terapia génica y destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de las VLPs(-VP4) de la invención en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas, vectores para terapia génica (delivery systems), etc. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, aves, frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV). En otra realización particular, dicho medicamento es un vector para terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de VLPs(-VP4) de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales, en particular, aves, frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV). En una realización particular, dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces. En una realización preferida, la vacuna proporcionada por esta invención es una vacuna útil para proteger pollos de la infección causada por IBDV.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de VLPs(-VP4) de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de las VLPs(-VP4) y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente farmacéuticamente aceptable.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítipo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará

en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en
5 sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1

Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 en células de insecto

10

1.1 Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 con dos rBVs independientes en células de insecto

15

En este ejemplo se describen los resultados de una serie de experimentos diseñados para analizar la posibilidad de obtener VLPs de IBDV a partir de una estrategia que evita la síntesis de la poliproteína de IBDV y, por tanto, la presencia de la proteasa VP4 durante el proceso de ensamblaje. El diseño experimental se basa en la coexpresión de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV a partir de dos genes quiméricos independientes. Para ello, se han utilizado dos baculovirus recombinantes (rBVs) descritos previamente, FB/his-VP3 (Kochan, G., González, D. & Rodríguez, J. F.

20

(2003). Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. *Archives of Virology* 148, 723-744) y FB/VPX [también identificado como FB/pVP2 en esta descripción] (Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M.,

25

Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278, 322-331). Estos rBVs fueron generados mediante el clonaje en vectores apropiados de los DNA complementarios (cDNAs) codificadores de las proteínas pVP2 y pVP3 de IBDV. Dichos cDNAs fueron obtenidos por RT-PCR a partir del segmento

30

A del genoma de IBDV serotipo I cepa Soroa (número de acceso al NCBI, AAD30136). El rBV FB/his-VP3 expresa una proteína VP3 quimérica que en su extremo N-terminal contiene un tandem de 6 histidinas fusionadas a la secuencia de VP3 (Met754-Glu1012 de la poliproteína) denominada his-VP3. El rBV FB/pVP2 expresa la región codificadora de la proteína pVP2 (Met1-Ala512).

El análisis de la expresión de estas proteínas pVP2 y his-pVP3, bien de forma independiente o conjunta, se realizó en cultivos celulares. Para la realización de estos experimentos, se utilizaron cultivos en monocapa de células procedentes del insecto *Trichoplusia ni* (H5, Invitrogen) que fueron crecidos sobre cubreobjetos de cristal.

5 Dichos cultivos fueron infectados independientemente con FB/pVP2, FB/his-VP3, o co-infectados con ambos rBVs. La multiplicidad de infección fue de 5 unidades formadoras de placa (ufp)/célula. A las 48 horas después de la infección (hpi) las células fueron fijadas, e incubadas con sueros policlonales de conejo anti-VP2 y con sueros policlonales de rata anti-VP3 (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P.

10 & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). Después de sucesivos lavados, los cubreobjetos fueron incubados con sueros de cabra anti-rata conjugado con Alexa 594 y con sueros de cabra anti-conejo conjugado a Alexa 488 (Jackson Immunoresearch Laboratories,

15 Inc.). Los núcleos celulares fueron teñidos con el marcador específico To-Pro-3 (Molecular Probes, Inc.). Finalmente, las muestras se visualizaron por epifluorescencia con un microscopio Zeiss Axiovert 200 equipado con el sistema confocal Bio Rad Radiance 2100. Las imágenes obtenidas se almacenaron utilizando el equipo de software Laser Sharp Package (Bio Rad). Como se muestra en la Figura 2a, en los

20 cultivos infectados con FB/pVP2 el suero anti-VP2 mostró una señal granular fina mezclada con estructuras tubulares ambas distribuidas en todo el citoplasma. La señal anti-VP3, detectada en las células infectadas con el rBV FB/his-VP3, se caracterizó por la presencia de acumulaciones de forma esférica alrededor del núcleo y, aparentemente, huecas. En los cultivos coinfectados con ambos rBV se detectó una notable

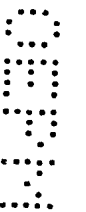
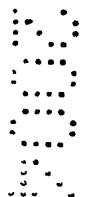
25 modificación en el patrón de distribución de ambas proteínas. En estas células, las señales específicas de pVP2 y VP3 se colocalizaron en acumulaciones esféricas y densas, sugiriendo que su coexpresión permitía la formación de complejos pVP2/his-VP3 (Figura 2c a la 2e).

Con la intención de caracterizar estas estructuras en mayor detalle, extractos

30 similares, correspondientes a células infectadas con FB/pVP2+FB/hisVP3 fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Como control, y en paralelo, se analizaron por la misma técnica cultivos de células H5 infectadas con la cepa silvestre del virus FBD (FastBacDual, Invitrogen). Después de la infección, las

células fueron recogidas a las 48 h, y procesadas como se ha descrito previamente (Fernández-Arias A, Risco C, Martínez S, Albar JP & Rodríguez JF. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79:1047-1054) para su análisis en cortes ultrafinos por TEM. Como se muestra en la Figura 2, el citoplasma de las células coinfectadas contiene agregados formados por una mezcla de túbulos y estructuras similares a cápsidas (Figura 2g, 2h y 2i). Estos agregados no fueron observados en ningún caso en las muestras correspondientes a células infectadas con el virus silvestre FBD (Figura 2f). El aspecto y el tamaño de los túbulos, así como de las estructuras similares a cápsidas fue semejante a los descritos previamente en cultivos celulares infectados con VT7/Poly, un recombinante del virus vaccinia que expresa el gen de la poliproteína de IBDV (Fernández-Arias A, Risco C, Martínez S, Albar JP & Rodríguez JF. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79:1047-1054).

Para establecer de forma inequívoca que la coexpresión de pVP2 e his-VP3 permitía el ensamblaje y, por tanto, la obtención de VLPs-(VP4), se decidió purificar las partículas formadas. Para ello, se infectaron con FB/pVP2+FB/his-VP3 cultivos de células H5. 60 hpi, las células se homogeneizaron y los extractos se separaron en gradientes de sacarosa tal y como se ha descrito previamente (Lombardo E, Maraver A, Castón JR, Rivera J, Fernández-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL & Rodríguez JF. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:6973-6983). Después de su centrifugación, los gradientes fueron fraccionados, y las distintas fracciones fueron analizadas por TEM tal como se ha descrito previamente (Lombardo E *et al.*, citado *supra*). Como control, y sujetos al mismo procedimiento, se fraccionaron gradientes correspondientes a extractos de células infectadas con el rBV FB/VPX o con el rBV FBD/Poly-VP1. El virus recombinante FBD/Poly-VP1 expresa simultáneamente la poliproteína y el polipéptido VP1. Como era predecible, la infección con FBD/Poly-VP1 tenía como resultado una eficiente producción de VLPs (Maraver A, Oña A, Abaitua F, González D, Clemente R, Diaz-Ruiz A, Castón JR, Pazos F & Rodríguez JF. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal



disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49). Por otra parte, las fracciones correspondientes a las células infectadas con FB/VPX sólo contenían túbulos de aspecto retorcido. Los gradientes correspondientes a células coinfectadas con los rBVs FB/pVP2+FB/his-VP3 contenían túbulos rígidos de tipo I en las fracciones cercanas al fondo del gradiente, y VLPs-(VP4) en las centrales y en las fracciones superiores (Figura 3b). Las VLPs-(VP4) aisladas de las células coinfectadas con rBV FB/pVP2+FB/his-VP3 tenían un diámetro de 65-70 nm, así como un contorno poligonal característico, absolutamente indistinguible de las VLPs purificadas de cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49) o de los cultivos infectados con VT7/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054).

Con la intención de conseguir una caracterización bioquímica del material obtenido, se realizaron experimentos de western-blot en los que las distintas fracciones se enfrentaron a sueros específicos contra las proteínas VP1, pVP2, VP3 y VP4 (Fernández-Arias *et al.* 1998, Lombardo *et al.*, 2000). Como control se utilizaron extractos de células infectadas con IBDV. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3d. Como se esperaba, las bandas correspondientes a los polipéptidos VP1 y VP4 sólo fueron detectadas en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1. Los patrones correspondientes a pVP2/VP3 en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1 o coinfectadas con FB/VPX+ FB/his-VP3 fueron similares, detectándose dos bandas correspondientes a pVP2 y VP3, respectivamente.

1.2 Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 con un rBV en células de insecto

Además, se procedió a la construcción del plásmido pFBD/pVP2-his-VP3. El primer paso de la construcción se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 en el vector pFBDual (Invitrogen). El fragmento de DNA correspondiente a pVP2 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos identificados

como Oligo I (SEQ ID NO: 1) y Oligo II (SEQ ID NO: 2) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglIII y HindIII y clonado en el vector pFBDual (Invitrogen) previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2. A continuación, se obtuvo un fragmento de DNA conteniendo la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 mediante digestión del plásmido pFB/his-VP3 (Kochan et al., 2003, citado *supra*) con el enzima RsrII, tratamiento con Klenow, y posterior restricción con KpnI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pFBD/pVP2 previamente digerido con los enzimas SmaI y KpnI. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2-his-VP3 (SEQ ID NO: 3) y contiene la secuencia de nucleótidos codificante de las proteínas pVP2 e his-pVP3 (esta última está codificada por la cadena complementaria a los nucleótidos 6734-7585 de la SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión his-VP3 (pVP2-his-VP3) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 se muestra en la SEQ ID NO: 4.

El plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 permite la obtención de un rBV, denominado FBD/pVP2-his-VP3, que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas simultáneamente [<http://invitrogen.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>].

Los resultados obtenidos con FBD/pVP2-his-VP3 son idénticos a los obtenidos mediante la coinfección con los rBVs FB/pVP2 y FD/his-VP3, obteniéndose VLPs(-VP4) de IBDV.

EJEMPLO 2

Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 y VP3 como dos genes independientes en levaduras

Con el fin de estudiar la posibilidad de obtener VLPs(-VP4) de IBDV en cultivos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se generó el vector pESCURA/pVP2-VP3-GFP con el gen heterólogo GFP unido al extremo N-terminal de VP3. El primer paso en la construcción del vector se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 de IBDV en el vector pESCURAinv. El plásmido pESCURAinv se

generó mediante digestión del vector pRS426 (Stratagene) con el enzima PvuII y religación de la mezcla de digestión. El vector resultante, pESCURAinv, contiene la región de clonaje múltiple en posición invertida con respecto a la del vector parental pRS426. El fragmento de DNA correspondiente a la proteína pVP2 se obtuvo mediante

5 PCR con los oligonucleótidos denominados Oligo III (SEQ ID NO: 5) y Oligo IV (SEQ ID NO: 6) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El fragmento fue

10 purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pESCURA.inv previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pESCURA/pVP2.

El plásmido pFB/VP3-GFP fue construido en dos etapas. La primera consistió en el clonaje de una fragmento de DNA, generado mediante PCR, que contiene la ORF

15 de la proteína VP3 de IBDV carente del codón de terminación. Esta PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos denominados Oligo V (SEQ ID NO: 7) y Oligo VI (SEQ ID NO: 8) y empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of*

20 *General Virology* 79, 1047-1054). El DNA resultante fue digerido con los enzimas EcoRI y BamHI y clonado en el vector pEGFP-N3 (Clontech) también digerido con los mismos enzimas. El plásmido resultante se denominó pVP3-GFP. A continuación, el plásmido pEGFP-GFP fue digerido con los enzimas EcoRI y NotI y clonado en el vector pFastBac1 (Invitrogen). El plásmido resultante se denominó pFB/VP3-GFP.

25 A continuación, se obtuvo un fragmento de DNA que contenía la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV fusionada a la región codificante de la proteína EGFP mediante digestión del plásmido pFB/VP3-GFP con los enzimas EcoRI y NotI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pESCURA/pVP2 previamente digerido con los enzimas EcoRI y NotI. El plásmido

30 resultante se denominó pESCURA/pVP2-VP3-GFP (SEQ ID NO: 9) y contiene las ORFs de las proteínas pVP2 y VP3-GFP bajo el control transcripcional de dos promotores independientes, GAL 1 y GAL 10, ambos inducibles por galactosa (la proteína pVP2 está codificada por la cadena de nucleótidos complementaria a los

nucleótidos 5862-7343 de la SEQ ID NO: 9). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión VP3-GFP (pVP2-VP3-GFP) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP se muestra en la SEQ ID NO: 10.

- 5 Posteriormente, pESCURA/pVP2-VP3-GFP se empleó para transformar un cultivo de la levadura *S. cerevisiae* haploide cepa 499 de acuerdo con un protocolo previamente descrito (Gietz, R.D. and R.A. Woods. (2002), Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350:87-96). Las levaduras transformadas con el plásmido fueron seleccionadas mediante crecimiento en
- 10 placas de medio SC (CSM + YNB, glucosa 2% y bacto agar) suplementadas con los aminoácidos triptófano, leucina e histidina y carentes de uracilo (-Ura). Tras una incubación de 48 h a 30°C, se seleccionó una colonia que fue empleada para la realización de los subsiguientes análisis de expresión de proteínas y formación de VLPs-(VP4).
- 15 El análisis de la expresión de las proteínas pVP2 y VP3 y formación de VLPs-(VP4) se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente para la caracterización de VLPs de IBVD en otros sistemas de expresión (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General*
- 20 *Virology* 79, 1047-1054; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like
- 25 partículas. *Journal of Virology* 73, 6973-698). La colonia seleccionada fue cultivada en medio líquido CSM (-Ura) + YNB suplementado con rafinosa al 2%. El cultivo se incubó a 30°C durante 24 h. Este cultivo fue empleado para inocular, a una densidad óptica (D.O.) de 0,2, un matraz de 200 ml de medio CSM (-Ura) + YNB suplementado con el inductor galactosa al 2%. El cultivo fue mantenido a 30°C durante 18 horas (hasta una D.O. entre 1,0 y 2,0). Las levaduras fueron centrifugadas a 3.000 rpm, 5 minutos a
- 30 4°C, se lavaron con agua destilada una vez, y el pellet fue resuspendido en tampón de lisis (TEN: Tris 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) + inhibidores de proteasas 2X (Compl Roche). Para la lisis se añadió un volumen de "glass beads" (cuentas o perlas de vidrio) de un tamaño aproximado de 425-600 micrones (Sigma).

Esta mezcla fue sometida al vortex vigoroso durante 30 segundos 4 veces, con intervalos de 30 segundos, y todo ello a 4°C. Tras ello se recuperó la fracción soluble por centrifugación de la mezcla de lisis a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Esta muestra fue sometida a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa de acuerdo con un

5 protocolo previamente descrito (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like

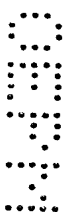
10 particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Las muestras obtenidas tras el fraccionamiento así como una muestra del material de partida fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) [Current Protocols in Molecular Biology] e inmunodetección por Western blot (Figura 4A) empleando sueros anti-pVP2 y anti-VP3 [Current Protocols in Molecular Biology].

15 Como se muestra en la Figura 4A, el Western blot reveló la presencia de bandas, con la masa molecular predicha correspondiente a las proteínas pVP2 (48 kDa) y VP3-GFP (61 kDa), así como otras bandas inmunoreactivas de menor tamaño producidas probablemente por degradación proteolítica tanto en la muestra inicial como en las diferentes fracciones del gradiente. Estos resultados demostraron de forma fehaciente la

20 correcta expresión de ambos polipéptidos en el cultivo de *S. cerevisiae* transformado con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3. A continuación, las distintas fracciones del gradiente fueron analizadas mediante TEM tal como se ha descrito previamente (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA

25 VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Como se muestra en la Figura 4B, el análisis mediante TEM de las fracciones del gradiente reveló la existencia de VLPs de IBDV en la fracciones superiores del gradiente. Estas VLPs, VLPs(-VP4), presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de las VLPs de IBDV obtenidas en otros

30 sistemas de expresión (Figura 4C).



REIVINDICACIONES

1. Una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLP(-VP4), caracterizada porque está constituida, únicamente, por
5 ensamblaje de proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV.

2. Un ácido nucleico caracterizado porque su secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que
10 comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

3. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 2.

15 4. Un sistema de expresión seleccionado entre:

a) un sistema de expresión que comprende (i) una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de
20 transcripción y, opcionalmente, de traducción, y (ii) una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción; y

25 b) un sistema de expresión que comprende una construcción génica según la reivindicación 3, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

30 5. Sistema de expresión según la reivindicación 4, caracterizado porque se selecciona entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PAC), cósmidos, y virus, que pueden contener, opcionalmente, un origen de replicación heterólogo.

6. Una célula huésped que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 2, o una construcción génica según la reivindicación 3, o un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.

5

7. Una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.

8. Célula huésped según la reivindicación 6 ó 7, caracterizada porque es una célula de insecto o una levadura.

10

9. Un procedimiento para la producción de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, que comprende cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, y, si se desea, recuperar dichas cápsidas vacías de IBDV.

15

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha célula huésped es una célula de insecto, que comprende las etapas de:

20

a) preparar un sistema de expresión seleccionado entre:

25

- un sistema de expresión constituido por un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica según la reivindicación 3, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción; y

30

- un sistema de expresión constituido por (i) un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y (ii) un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV;

- b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- 5 c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV; y
- d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV.

10 11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha célula huésped es una levadura, que comprende las etapas de:

- 15 a) preparar un sistema de expresión constituido por un plásmido que contiene una construcción génica según la reivindicación 3;
- b) transformar células de levadura con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- 20 c) cultivar las levaduras transformadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV; y
- 25 d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, las cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV.

30 12. Empleo de un sistema de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, para la producción y obtención de cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV según la reivindicación 1.

13. Empleo de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, en la elaboración de un medicamento.

14. Empleo según la reivindicación 13, en el que dicho medicamento es una vacuna frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.

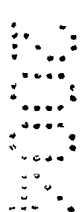
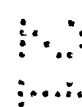
5 15. Empleo según la reivindicación 13, en el que dicho medicamento es un vector para terapia génica.

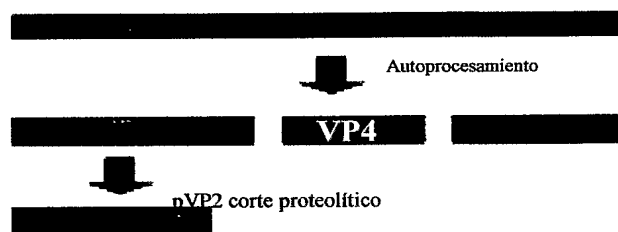
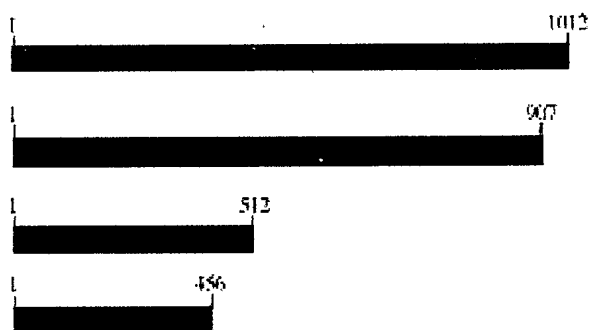
10 16. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías de IBDV, VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

17. Vacuna según la reivindicación 16, para proteger aves de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV).

15 18. Vacuna según la reivindicación 17, en la que dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces.

20 19. Una vacuna para proteger pollos de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV) que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías de IBDV, VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.



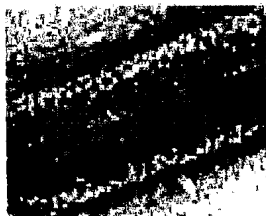
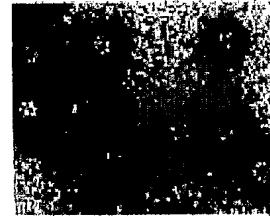
a*b***Construcción Génica****Estructura Resultante**

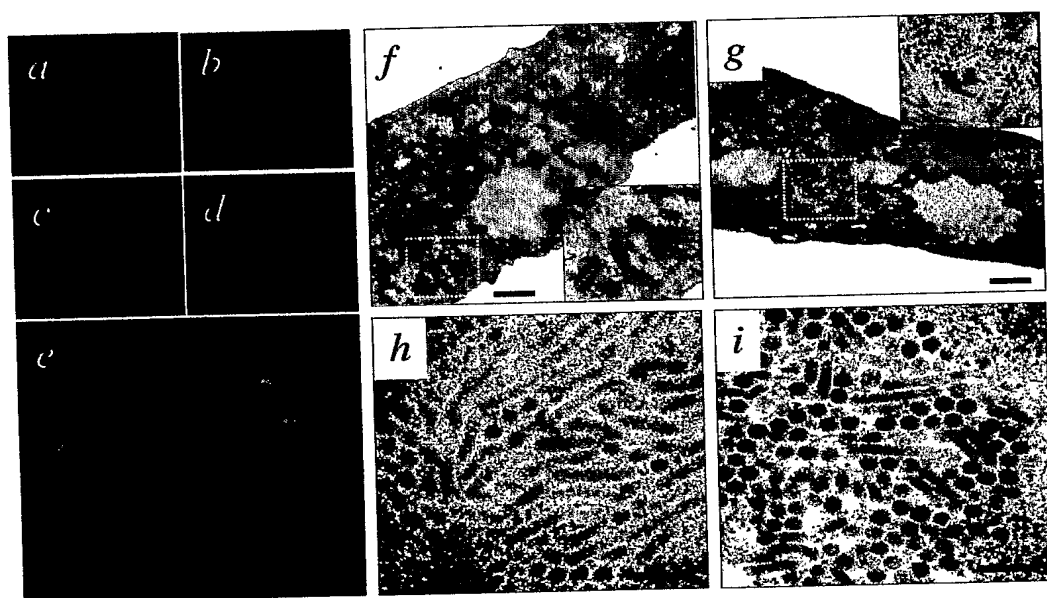
VLP (T=13) y Túbulos de Tipo 1*

Túbulos de Tipo I †

Túbulos retorcidos‡

23 nm T= 1 Cápsidas

VLP**Túbulos Tipo I****Túbulos Retorcidos****23 nm T=1 Cápsidas****Figura 1**

**Figura 2**

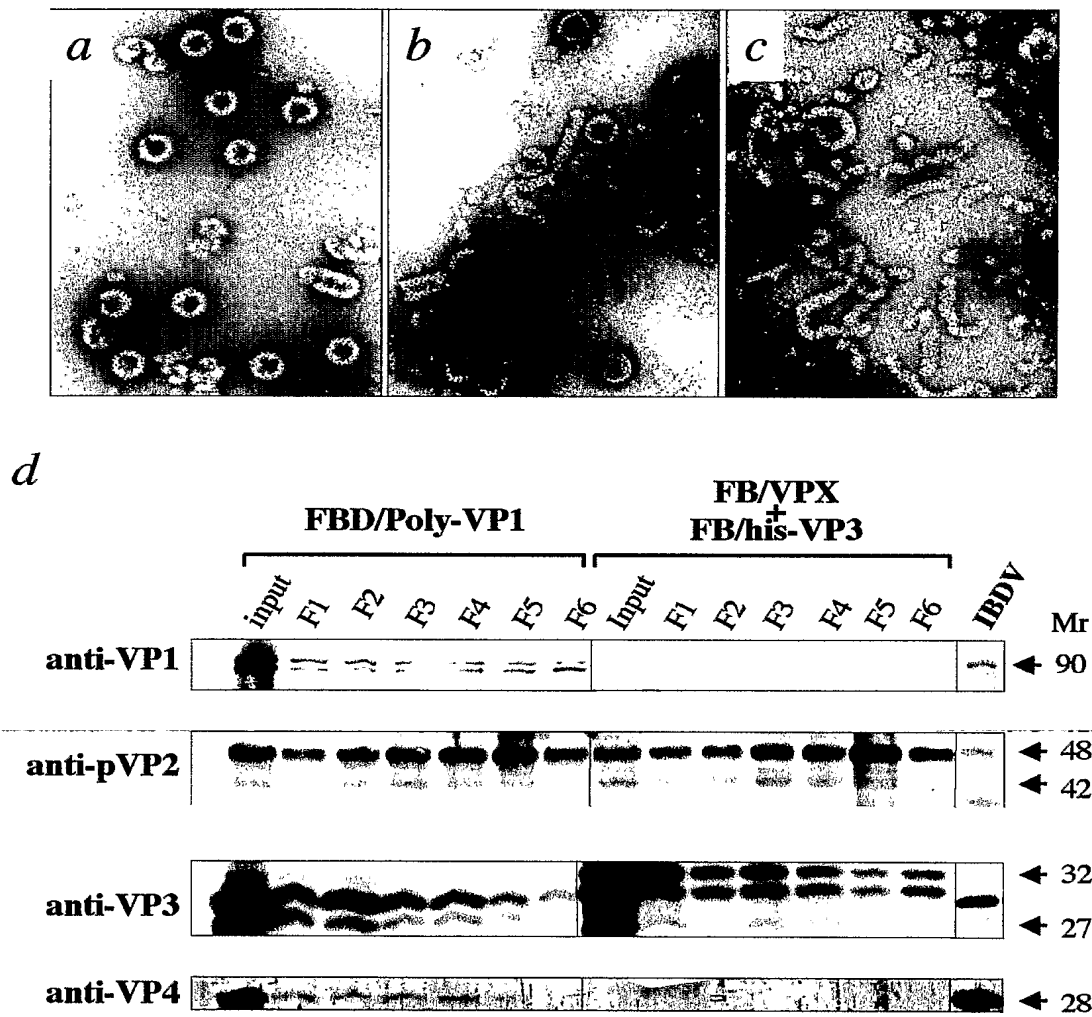


Figura 3

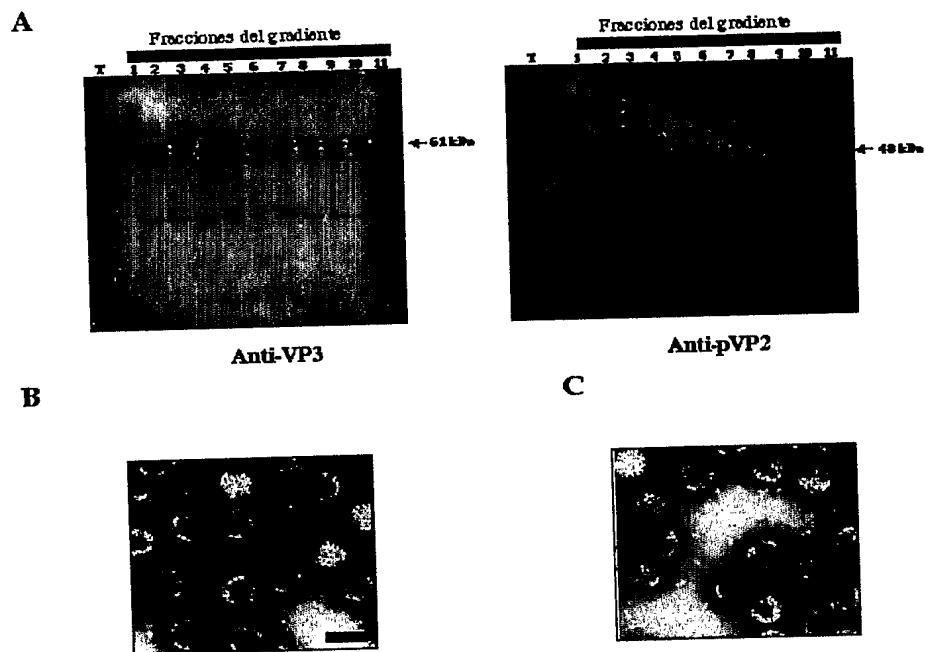


Figura 4

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
- 5 <110> BIONOSTRA, S.L.
- <120> CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs (-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA
10 ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO
DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES
- <130> VLPs (-VP4)
- <160> 10
- 15 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 35
- 20 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligo I
- 25 <400> 1
- gcgcagatct atgacaaacc tgtcagatca aaccc 35
- <210> 2
- <211> 34
- 30 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Oligo II
- <400> 2
- 40 gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc 34
- <210> 3
- <211> 7595
- <212> DNA
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3
- 50 <220>
- <221> promotor
- <222> (157)..(285)
- <223> Promotor ppolh
- 55 <220>
- <221> CDS
- <222> (291)..(1289)
- <223> pVP2 ORF

<220>
 <221> promotor
 <222> (7443)..(7503)
 <223> Promotor p10

5

<400> 3
 ggggtgatcaa gtcttcgctcg agtgattgta aataaaatgt aatttacagt atagtatttt 60

10

aattaatata caaatgattt gataataatt cttattttaac tataatatat tgtgttgggt 120

tgaattaaag gtccgtatac tccggaatat taatagatca tggagataat taaaatgata 180

accatctcgc aaataaataa gtattttact gttttcgtaa cagttttgta ataaaaaaac 240

15

ctataaatat tccggattat tcataccgctc ccaccatcgg gcgcggatct atg aca 296
 Met Thr
 1

20

aac ctg tca gat caa acc cag cag att gtt ccg ttc ata cgg agc ctt 344
 Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Leu
 5 10 15

25

ctg atg cca aca acc gga ccg gcg tcc att ccg gac gac acc ctg gag 392
 Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr Leu Glu
 20 25 30

30

aag cac act ctc agg tca gag acc tcg acc tac aat ttg act gtg ggg 440
 Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr Val Gly
 35 40 45 50

gac aca ggg tca ggg cta att gtc ttt ttc cct gga ttc cct ggc tca 488
 Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ser
 55 60 65

35

att gtg ggt gct cac tac aca ctg cag ggc aat ggg aac tac aag ttc 536
 Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr Lys Phe
 70 75 80

40

gat cag atg ctc ctg act gcc cag aac cta ccg gcc agt tac aac tac 584
 Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr Asn Tyr
 85 90 95

45

tgc agg cta gtg agt cgg agt ctc aca gtg agg tca agc aca ctt cct 632
 Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr Leu Pro
 100 105 110

50

ggt ggc gtt tat gca cta aac ggc acc ata aac gcc gtg acc ttc caa 680
 Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr Phe Gln
 115 120 125 130

gga agc ctg agt gaa ctg aca gat gtt agc tac aat ggg ttg atg tct 728
 Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu Met Ser
 135 140 145

55

gca aca gcc aac atc aac gac aaa att ggg aac gtc cta gta ggg gaa 776
 Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val Gly Glu
 150 155 160

	ggg gtc acc gtc ctc agc tta ccc aca tca tat gat ctt ggg tat gtg	824
	Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly Tyr Val	
	165 170 175	
5	agg ctt ggt gac ccc att ccc gca ata ggg ctt gac cca aaa atg gta	872
	Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys Met Val	
	180 185 190	
10	gcc aca tgt gac agc agt gac agg ccc aga gtc tac acc ata act gca	920
	Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile Thr Ala	
	195 200 205 210	
15	gcc gat gat tac caa ttc tca tca cag tac caa cca ggt ggg gta aca	968
	Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly Val Thr	
	215 220 225	
20	atc aca ctg ttc tca gcc aac att gat gcc atc aca agc ctc agc gtt	1016
	Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Val	
	230 235 240	
	ggg gga gag ctc gtg ttt cga aca agc gtc cac ggc ctt gta ctg ggc	1064
	Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val Leu Gly	
	245 250 255	
25	gcc acc atc tac ctc ata ggc ttt gat ggg aca acg gta atc acc agg	1112
	Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile Thr Arg	
	260 265 270	
30	gct gtg gcc gca aac aat ggg ctg acg acc ggc acc gac aac ctt atg	1160
	Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn Leu Met	
	275 280 285 290	
35	cca ttc aat ctt gtg att cca aca aac gag ata acc cag cca atc aca	1208
	Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro Ile Thr	
	295 300 305	
40	tcc atc aaa ctg gag ata gtg acc tcc aaa agt ggt ggt cag gca ggg	1256
	Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln Ala Gly	
	310 315 320	
	gat cag atg tca tgg tcg gca aga ggg agc cta gcagtgcga tccatggtgg	1309
	Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu	
	325 330	
45	caactatcca ggggccctcc gtcccgtcac gctagtggcc tacgaaagag tggcaacagg	1369
	atccgtcggt acggtcgctg gggtagcaa ctccgagctg atcccaaata ctgaactagc	1429
50	aaagaacctg gttacagaat acggccgatt tgaccacagga gccatgaact acacaaaatt	1489
	gatactgagt gagagggacc gtcttggcat caagaccgtc tggccaacaa gggagtacac	1549
	tgactttcgt gaatacttca tggaggtggc cgacctcaac tctcccctga agattgcagg	1609
55	agcattcggc ttcaaagaca taatccgggc cataaggagg atagctgtgc cggtggtctc	1669
	cacattgttc ccacctgccg ctcccctagc ccatgcaatt ggggaaggtg tagactacct	1729
60	gctgggcat gaggcccagg ccgcttcagg aactgctcga gccgcgtcag gaaaagcaag	1789

agctgcctca ggccgcataa ggcagctgac tctcgcctaa gcttgctcgag aagtactaga 1849
 ggatcataat cagccataacc acatttgtag aggttttact tgcttttaaaa aacctcccac 1909
 5 aacctcccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttggttaac ttgtttattg 1969
 cagcttataa tgggttataa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 2029
 10 tttcactgca ttctagttgt ggtttggtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 2089
 tctgatcact gcttgagcct aggagatccg aaccagataa gtgaaatcta gttccaaact 2149
 attttgtcat ttttaatttt cgtatttagct tacgacgcta caccagttc ccatctattt 2209
 15 tgtcactctt ccctaaataa tcttaaaaa ctccatttcc acccctocca gttcccaact 2269
 attttgtcgg cccacagcgg ggcatttttc ttctgttat gtttttaata aaacatcctg 2329
 ccaactccat gtgacaaacc gtcactctcg gctacttttt ctctgtcaca gaatgaaaat 2389
 20 ttttctgtca tctcttcgtt attaatgttt gtaattgact gaatatcaac gcttatttgc 2449
 agcctgaatg gcgaatggga cgcgcctgt agcggcgcat taagcgcggc ggggtgtggtg 2509
 25 gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag cgcccgctcc tttcgcttcc 2569
 ttcccttctt ttctcgccac gttcgccggc tttcccgctc aagctctaaa tcggggggtc 2629
 cctttagggt tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt 2689
 30 gatgggtcac gtagtgggoc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag 2749
 tccacgttct ttaatagtgg actcttggtc caaactggaa caaactcaa ccctatctcg 2809
 35 gtctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag 2869
 ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatat taacgtttac aatttcaggt 2929
 ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta aatacattca 2989
 40 aatatgtatc cgctcatgag acaataacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg 3049
 aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc 3109
 45 cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg 3169
 ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt 3229
 cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc actttttaaag ttctgctatg tggcgcggta 3289
 50 ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat 3349
 gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga 3409
 55 gaattatgca gtgctgccat aacctgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca 3469
 acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact 3529
 60 cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc 3589

acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact 3649
 ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt 3709
 5 ctgcgctcgg cccttcgggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt 3769
 gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt 3829
 10 atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata 3889
 ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatacttttag 3949
 attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat 4009
 15 ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa 4069
 aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca 4129
 20 aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt 4189
 ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg 4249
 tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate 4309
 25 ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgct ttaccggggt ggactcaaga 4369
 cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc 4429
 30 agcttggagc gaacgacctc caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc 4489
 gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca 4549
 ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg 4609
 35 ~~tttegecacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta~~ 4669
 tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct 4729
 40 cacatgttct ttctgcgtt atccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag 4789
 tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa 4849
 gcggaagagc gcctgatgct gtattttctc cttacgcctc tgtgcggtat ttcacaccgc 4909
 45 agaccagccg cgtaacctgg caaaatcggc tacggttgag taataaatgg atgccttgcg 4969
 taagcgggtg tgggcggaca ataaagtctt aaactgaaca aaatagatct aaactatgac 5029
 50 aataaagtct taaactagac agaatagttg taaactgaaa tcagtccagt tatgctgtga 5089
 aaaagcatac tggacttttg ttatggctaa agcaaactct tcattttctg aagtgcaaat 5149
 tgcccgtcgt attaaagagg ggcgtggcca agggcatggt aaagactata ttcgcggcgt 5209
 55 tgtgacaatt taccgaacaa ctccgcggcc ggggaagcga tctcggcttg aacgaattgt 5269
 taggtggcgg tacttgggtc gatatcaaag tgcatactt cttcccgtat gcccaacttt 5329
 60 gtatagagag cactgcggg atcgtcaccg taatctgctt gcacgtagat cacataagca 5389

ccaagcgcgt tggcctcatg cttgaggaga ttgatgagcg cggaggcaat gccctgcctc 5449
 cgggtgctcgc cggagactgc gagatcatag atatagatct cactacgcgg ctgctcaaac 5509
 5 ctgggcagaa cgtaagccgc gagagcgcca acaaccgctt cttggtcgaa ggcagcaagc 5569
 gcgatgaatg tcttactacg gagcaagttc ccgaggtaat cggagtcggg ctgatgttgg 5629
 gagtaggtgg ctacgtctcc gaactcacga ccgaaaagat caagagcagc ccgcatggat 5689
 10 ttgacttggg cagggccgag cctacatgtg cgaatgatgc ccatacttga gccacctaac 5749
 tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta acatcggtgc tgctgcgtaa catcgttgct 5809
 15 gctccataac atcaaacatc gacccacggc gtaacgcgct tgctgcttgg atgcccagagg 5869
 catagactgt acaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgcggttacc 5929
 accgctgcgt tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatacgtc acttgcatta 5989
 20 cagtttacga accgaacagg cttatgtcaa ctgggttcgt gccttcatcc gtttccacgg 6049
 tgtgcgtcac ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt cctggctggc 6109
 25 gaacgagcgc aaggtttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct tgctgttctt 6169
 ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcggta gacctcggcc 6229
 gtgcggcgcc ttgccgggtg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgcaccc tcggttttct 6289
 30 ggaaggcgag catcgtttgt tcgcccagga ctctagctat agttctagtg gttggcctac 6349
 gtacccgtag tggtatggc agggcttgcc gcccgcagct tggtgcgag ccctgggcct 6409
 35 tcacccgaac ttgggggttg ggggtgggaa aaggaagaaa cgcgggcgta ttggtcccaa 6469
 tggggtctcg gtggggtatc gacagagtgc cagccctggg accgaacccc gcgtttatga 6529
 acaaacgacc caacaccggt gcgttttatt ctgtcttttt attgccgtca tagcgcgggt 6589
 40 tccttcgggt attgtctcct tccgtgttcc agttagcctc ccccatctcc cggtagcgca 6649
 tgcttcgaga ctgcaggctc tagattcgaa agcggccgcg actagtgagc tcgtcgacgt 6709
 45 aggcctttga attccggatc ctactcaag gtccatca ca gagacggctc tgatccagcg 6769
 gccagccga ccagggggtc tctgtgttgg agcattgggt tttggcttgg gctttggtag 6829
 agcccgccctg ggattgcgat gcttcatctc catcgcagtc aagagcagat ctttcatctg 6889
 50 ttcttgggtt gggccacgct catggttgat ttcataagact ttggcaactt cgtctatgaa 6949
 agcttggggg ggctctgcct gtccctggagc cccgtagatc gacgtagctg cccttaggat 7009
 55 ttgttcttct gatgccaacc ggctcttctc tgcattgcag tagtctagat agtcctcgtt 7069
 tgggtccggg atttctcgtt tgttctgcca gtactttacc tggcctgggc ttggccctcg 7129
 60 gtgcccattg agtgctaccc attctggtgt tgcaaagtag atgcccatgg tctccatctt 7189

ctttgagatc cgtgtgtctt tttccctctg tgcttctct ggtgtggggc cccgagcctc 7249
 cactccgtag cctgctgtcc cgtacttggc cctttgcgac ttgctgctg cttgtggtgc 7309
 5 gtttgcaaga aaatttcgca tccgatgggc gttcgggtcg ctgagtgcga agttggccat 7369
 gtcagtcaca atcccattct cttccagcca catgaacaca ctgagtgcag attggaatag 7429
 10 tgggtccacg ttggctgctg cttccattgc tctgacggca ctctcgagtt cgggggtctc 7489
 tttgaactct gatgcagcca tggcgccctg aaaatacagg ttttcggtcg ttgggatatc 7549
 gtaatcgtga tggatggtgatggt gatggttagta cgacatgggt tcggac 7595

15

<210> 4
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3

<400> 4

25 Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45

35

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

40

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95

Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110

45

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 115 120 125

50

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 130 135 140

Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 145 150 155 160

55

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175

60

Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 195 200 205
 5 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220
 Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 225 230 235 240
 10 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
 245 250 255
 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270
 15 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285
 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300
 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320
 25 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu
 325 330
 30 <210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligo III
 <400> 5
 gcgcagatct atgacaaacc tgtcagatca aaccc 35
 40 <210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligo IV
 <400> 6
 50 gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc 34
 <210> 7
 <211> 33
 55 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Oligo V

.
 .
 .
 .

.
 .
 .

.
 .
 .
 .
 .
 .

.
 .
 .
 .
 .
 .

<400> 7
gcgcgaattc gatggcatca gagttcaaag aga

33

5 <210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligo VI

<400> 8
15 cgcggatccc tcaaggctct catcagagac gg

32

<210> 9
<211> 9600
<212> DNA
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP

25 <220>
<221> promotor
<222> (5649)..(5859)
<223> Promotor GAL 1 (pVP2)

30 <220>
<221> promotor
<222> (7402)..(8080)
<223> Promotor GAL 2 (VP3-GFP)

35 <220>
<221> CDS
<222> (8086)..(9597)
<223> VP3-GFP ORF

40 <400> 9
ggccgcacta gtatcgatgg attacaagga tgacgacgat aagatctgag ctcttaatta 60
acaattcttc gccagagggtt tgggtcaagtc tccaatcaag gttgtcggct tgtctacctt 120
45 gccagaaatt tacgaaaaga tggaaaaggg tcaaatcggt ggtagatacg ttgttgacac 180
ttctaaataa gcgaatttct tatgatttat gattttttatt attaaataag ttataaaaaa 240
50 aataagtgtat tacaattttt aaagtgactc ttaggtttta aaacgaaaat tcttattctt 300
gagtaactct ttctgttagg tcagggttgc ttctcaggta tagcatgagg tcgctccaat 360
tcagctgcat. taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggg ggtttgcgta ttgggcgctc 420
55 ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctccggtcgtt cggctgcggc gagcgggtatc 480
agctcactca aaggcggtta tacgggttat cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 540
60 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt 600

tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 660
 gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 720
 5 ctctcctggt cgcaccctgc cgcttacggg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag 780
 cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 840
 caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 900
 10 ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg cactggcag cagccactgg 960
 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtgggtggc 1020
 15 taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac 1080
 cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg 1140
 tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 1200
 20 gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggatttttgt 1260
 catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaat gaagtttta 1320
 25 atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga 1380
 ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctg 1440
 gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg 1500
 30 agaccacgc tcaccggctc cagatttata agcaataaac cagccagccg gaagggccga 1560
 gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 1620
 35 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg 1680
 catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc 1740
 aaggcgagtt acatgatccc ccatggttggt caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc 1800
 40 gatcgttggtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca 1860
 taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac 1920
 45 caagtcattc tgagaatagt gtatgcccgc accgagttgc tcttgcccgc cgtcaatacg 1980
 ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc 2040
 ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aacccactcg 2100
 50 tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 2160
 aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatggt gaatactcat 2220
 55 actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 2280
 catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa 2340
 agtgccacct gaacgaagca tctgtgcttc atttttaga acaaaaatgc aacgcgagag 2400
 60

cgctaatttt tcaaacaaag aatctgagct gcattttttac agaacagaaa tgcaacgcga 2460
 aagcgctatt ttaccaacga agaattctgtg cttcattttt gtaaaacaaa aatgcaacgc 2520
 5 gagagcgcta atttttcaaa caaagaatct gagctgcatt ttacagaaac agaaatgcaa 2580
 cgcgagagcg ctattttacc aacaaagaat ctatacttct tttttgttct acaaaaatgc 2640
 10 atcccgagag cgctattttt ctaacaaagc atcttagatt actttttttc tcctttgtgc 2700
 gctctataat gcagtctctt gataactttt tgcactgtag gtccgттаag gttagaagaa 2760
 ggctactttg gtgtctattt tctcttccat aaaaaagcc tgactccact tcccgcgттt 2820
 15 actgattact agcgaagctg cgggtgcatt ttttcaagat aaaggcatcc ccgattatat 2880
 tctataccga tgtggattgc gcatactttg tgaacagaaa gtgatagcgt tgatgattct 2940
 tcattggтca gaaaattatg aacggттtct tctattttgt ctctatatac tacgtatagg 3000
 20 aaatgттtac attttctgat tgtттtctgat tcactctatg aatagттtct actacaattt 3060
 ttttgtctaa agagtaatac tagagataaa cataaaaaat gtagaggтcг agттtagatg 3120
 25 caagттcaag gagcgaaagg tggatggгta ggттtatatg ggatatagca cagagatata 3180
 tagcaaagag atactттtga gcaatгттg tggaaгcгgt attcгcaata tттtagtagc 3240
 tcгttacagt ccгgtгcгтт tттgгттттt tgaaagtгcг tcttcagagc гctттtgгтт 3300
 30 ttcaaaagcг ctctgaagтт cctatacttt ctagagaata ggaactтcгг aataggaact 3360
 tcaaagcгтт tccgaaaacг agcгctтcгг aaaatгcaac гcгagctгcгг cacatacagc 3420
 35 ~~tcactгtca cгtгcгacct atatctгcгг гttгcctгta tatatatata catgagaaga 3480~~
 acггcatagt гcгггттттat гcttaaatgc gtacttatat гcггtctattt atgtaggatg 3540
 40 aaaggtagtc tagtacctcc tgtgatatta tcccattcca тcггггггtat cгtatгcttc 3600
 cttcagcact accттttagc тгттctatat гctгccactc ctcaattгga ttagтctcat 3660
 cттcaatgc tatcattтcc tттgatattg gatcatacta agaaaccatt attatcatga 3720
 45 cattaaccta taaaaatagg cгtatcacga ggccтттcгг tctcгcгcгг тtcггггatg 3780
 acггггaaaa cctctgacac atгcagctcc cггgagacггг cacagctтgt ctгtaagcгг 3840
 atгccггггag cagacaagcc cгtcagгггг cгtcagcгггг тгттггcгггг тгtcггггггct 3900
 50 ггcttaacta тcггггcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatacc acagctттttc 3960
 aattcaattc atcattттtt tттtattctt tттттгatt тcггттттctt тgaaattттt 4020
 55 ttgattcггг aatctccgaa cagaaggaaг aacgaaggaa ggagcacaga cttagattгг 4080
 tatatatagc catatgtagt гttgaagaaa catgaaattg cccagtattc тtaaccцаac 4140
 тgcacagaaс aaaaacctgc aggaaacgaa gataaatcat гtcgaaagct acatataagg 4200
 60

aacgtgctgc tactcatcct agtcctgttg ctgccaagct atttaatatc atgcacgaaa 4260
 agcaaacaaa cttgtgtgct tcattggatg ttcgtaccac caaggaatta ctggagttag 4320
 5 ttgaagcatt aggtcccaaa atttgtttac taaaaacaca tgtggatatc ttgactgatt 4380
 tttccatgga gggcacagtt aagccgctaa aggcattatc cgccaagtac aattttttac 4440
 10 tcttcgaaga cagaaaattt gctgacattg gtaatacagt caaattgcag tactctgcgg 4500
 gtgtatacag aatagcagaa tgggcagaca ttacgaatgc acacggtgtg gtgggcccag 4560
 gtattgttag cggtttgaag caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct agaggccttt 4620
 15 tgatgttagc agaattgtca tgcaagggtc ccctatctac tggagaatat actaagggtg 4680
 ctgttgacat tgcgaagagc gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct caaagagaca 4740
 tgggtggaag agatgaaggc tacgattggc tgattatgac acccggtgtg ggttttagatg 4800
 20 acaagggaga cgcattgggt caacagtata gaaccgtgga tgatgtggc tctacaggat 4860
 ctgacattat tattgttgga agaggactat ttgcaaaggc aagggatgct aaggtagagg 4920
 25 gtgaacgtta cagaaaagca ggctgggaag catatttgag aagatgcggc cagcaaaact 4980
 aaaaaactgt attataagta aatgcatgta tactaaactc acaaattaga gcttcaattt 5040
 30 aattatatca gttattacc tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 5100
 taccgcatca ggaaattgta aacgttaata ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt 5160
 aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcgga aatcccttat aaatcaaaag 5220
 35 aatagaccga gatagggttg agtgttggtc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga 5280
 acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg 5340
 40 aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggt cgagggtccg taaagcacta aatcggaacc 5400
 ctaaaggag ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg 5460
 aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc 5520
 45 gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgtaca gggcgctcg cgccattcgc 5580
 cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtcg ggccctctcg ctattacgcc 5640
 50 agctggatct tcgagcgtcc caaaacctc tcaagcaagg ttttcagtat aatgttacat 5700
 gcgtacacgc gtctgtacag aaaaaaaga aaaatttgaa atataaataa cgttcttaat 5760
 actaacataa ctataaaaaa ataaataggc acctagactt caggttgtct aactccttcc 5820
 55 ttttcggtta gagcggtatc tagctagccg cggtaccaag cttaggcgag agtcagctgc 5880
 cttatgcggc ctgaggcagc tcttgctttt cctgacgcgg ctcgagcagt tctgaagcg 5940
 60 gcctgggcct catcgcccag caggtagtct acaccttccc caattgcatg ggctagggga 6000

gcggcaggtg ggaacaatgt ggagaccacc ggcacagcta tcctccttat ggcccggatt 6060
 atgtctttga agccgaatgc tcctgcaatc ttcaggggag agttgaggtc ggccacctcc 6120
 5 atgaagtatt cacgaaagtc agtgtactcc cttggtggcc agacgggtctt gatgccaaga 6180
 cggtcctctc cactcagtat caattttgtg tagttcatgg ctcttgggtc aaatcggccg 6240
 10 tattctgtaa ccaggttctt tgctagttca ggatttggga tcagctcgaa gttgctcacc 6300
 ccagcgaccg taacgacgga tcctgttgcc actctttcgt aggccactag cgtgacggga 6360
 cggagggccc ctggatagtt gccaccatgg atcgtcactg ctaggctccc tcttgccgac 6420
 15 catgacatct gatccctgc ctgaccacca cttttggagg tcactatctc cagtttgatg 6480
 gatgtgattg gctgggttat ctctttgtt ggaatcaca gattgaatgg cataaggttg 6540
 20 tcggtgccgg tcgtcagccc attgtttgcg gccacagccc tgggtattac cgttgctcca 6600
 tcaaagccta tgaggtagat ggtggcgccc agtacaaggc cgtggacgct tgttcgaaac 6660
 acgagctctc cccaacgct gaggtttgtg atggcatcaa tgttggctga gaacagtgtg 6720
 25 attgttacct cacctggttg gtactgtgat gagaattggt aatcatcggc tgcagttatg 6780
 gtgtagactc tgggcctgtc actgctgtca catgtggcta ccatttttgg gtcaagccct 6840
 30 attgcgggaa tggggtcacc aagcctcaca tacciaagat catatgatgt gggtaagctg 6900
 aggacggtga ccccttcccc tactaggacg tcccaattt tgcgttgat gttggctgtt 6960
 gcagacatca acccattgta gctaacatct gtcagttcac tcaggcttcc ttggaaggtc 7020
 35 ~~acggcgttta tgggtgccgtt tagtgcataa acgccaccag-gaagtgtgct tgacctcact 7080~~
 gtgagactcc gactcactag cctgcagtag ttgtaactgg ccggtagggt ctgggcagtc 7140
 40 aggagcatct gatcgaactt gtagttccca ttgccctgca gtgtgtagtg agcaccaca 7200
 attgagccag ggaatccagg gaaaaagaca attagccctg accctgtgtc cccacagtc 7260
 aaattgtagg tcgaggtctc tgacctgaga gtgtgcttct ccagggtgtc gtccggaatg 7320
 45 gacgcgggtc cggttgttg catcagaagg ctccgtatga acggaacaat ctgctgggtt 7380
 tgatctgaca ggtttgtcat agatccgggg ttttttctcc ttgacgttaa agtatagagg 7440
 50 tatattaaca attttttgtt gatactttta ttacatttga ataagaagta atacaaaccg 7500
 aaaatgttga aagtattagt taaagtgggt atgcagtttt tgcatttata tatctgttaa 7560
 tagatcaaaa atcatcgctt cgctgattaa ttacccca aataaggcta aaaaactaat 7620
 55 cgcattatca tcctatgggt gttaatttga ttcgttcatt tgaaggtttg tggggccagg 7680
 ttactgcaa tttttctct tcataaccat aaaagctagt attgtagaat ctttattgtt 7740
 60 cggagcagtg cggcgogagg cacatctgcg tttcaggaac gcgaccggtg aagacgagga 7800

	cgcacggagg agagtcttcc ttcggagggc tgtcaccgc tcggcggctt ctaatccgta	7860
	cttcaatata gcaatgagca gttaagcgta ttactgaaag ttccaaagag aagggttttt	7920
5	taggctaaga taatggggct ctttacattt ccacaacata taagtaagat tagatatgga	7980
	tatgtatatg gatattgtata tgggtggtaat gccatgtaat atgattatta aacttctttg	8040
10	cgtccatcca aaaaaaaagt aagaattttt gaaaattcga attcg atg gct gca tca	8097
	Met Ala Ala Ser	
	1	
15	gag ttc aaa gag acc ccc gaa ctc gag agt gcc gtc aga gca atg gaa	8145
	Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val Arg Ala Met Glu	
	5 10 15 20	
20	gca gca gcc aac gtg gac cca cta ttc caa tct gca ctc agt gtg ttc	8193
	Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala Leu Ser Val Phe	
	25 30 35	
25	atg tgg ctg gaa gag aat ggg att gtg act gac atg gcc aac ttc gca	8241
	Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met Ala Asn Phe Ala	
	40 45 50	
30	ctc agc gac ccg aac gcc cat cgg atg cga aat ttt ctt gca aac gca	8289
	Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe Leu Ala Asn Ala	
	55 60 65	
35	cca caa gca ggc agc aag tcg caa agg gcc aag tac ggg aca gca ggc	8337
	Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Gly Thr Ala Gly	
	70 75 80	
40	tac gga gtg gag gct cgg ggc ccc aca cca gag gaa gca cag agg gaa	8385
	Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu Ala Gln Arg Glu	
	85 90 95 100	
45	aaa gac aca cgg atc tca aag aag atg gag acc atg ggc atc tac ttt	8433
	Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met Gly Ile Tyr Phe	
	105 110 115	
50	gca aca cca gaa tgg gta gca ctc aat ggg cac cga ggg cca agc cca	8481
	Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg Gly Pro Ser Pro	
	120 125 130	
55	ggc cag gta aag tac tgg cag aac aaa cga gaa ata ccg gac cca aac	8529
	Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile Pro Asp Pro Asn	
	135 140 145	
60	gag gac tat cta gac tac gtg cat gca gag aag agc cgg ttg gca tca	8577
	Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser Arg Leu Ala Ser	
	150 155 160	
65	gaa gaa caa atc cta agg gca gct acg tcg atc tac ggg gct cca gga	8625
	Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Gly Ala Pro Gly	
	165 170 175 180	
70	cag gca gag cca ccc caa gct ttc ata gac gaa gtt gcc aaa gtc tat	8673
	Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val Ala Lys Val Tyr	
	185 190 195	

		gaa	atc	aac	cat	gga	cgt	ggc	cca	aac	caa	gaa	cag	atg	aaa	gat	ctg	8721	
		Glu	Ile	Asn	His	Gly	Arg	Gly	Pro	Asn	Gln	Glu	Gln	Met	Lys	Asp	Leu		
					200					205						210			
5		ctc	ttg	act	gcg	atg	gag	atg	aag	cat	cgc	aat	ccc	agg	cgg	gct	cta	8769	
		Leu	Leu	Thr	Ala	Met	Glu	Met	Lys	His	Arg	Asn	Pro	Arg	Arg	Ala	Leu		
				215					220					225					
10		cca	aag	ccc	aag	cca	aaa	ccc	aat	gct	cca	aca	cag	aga	ccc	cct	ggt	8817	
		Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Asn	Ala	Pro	Thr	Gln	Arg	Pro	Pro	Gly		
			230					235					240						
15		cgg	ctg	ggc	cgc	tgg	atc	agg	acc	gtc	tct	gat	gag	gac	ctt	gag	gga	8865	
		Arg	Leu	Gly	Arg	Trp	Ile	Arg	Thr	Val	Ser	Asp	Glu	Asp	Leu	Glu	Gly		
		245				250						255					260		
20		tcc	atc	gcc	acc	atg	gtg	agc	aag	ggc	gag	gag	ctg	ttc	acc	ggg	gtg	8913	
		Ser	Ile	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val		
					265					270						275			
		gtg	ccc	atc	ctg	gtc	gag	ctg	gac	ggc	gac	gta	aac	ggc	cac	aag	ttc	8961	
		Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe		
					280					285					290				
25		agc	gtg	tcc	ggc	gag	ggc	gag	ggc	gat	gcc	acc	tac	ggc	aag	ctg	acc	9009	
		Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr		
				295				300						305					
30		ctg	aag	ttc	atc	tgc	acc	acc	ggc	aag	ctg	ccc	gtg	ccc	tgg	ccc	acc	9057	
		Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr		
			310					315					320						
		ctc	gtg	acc	acc	ctg	acc	tac	ggc	gtg	cag	tgc	ttc	agc	cgc	tac	ccc	9105	
		Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro		
35		325				330					335					340			
40		gac	cac	atg	aag	cag	cac	gac	ttc	ttc	aag	tcc	gcc	atg	ccc	gaa	ggc	9153	
		Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly		
					345						350					355			
		tac	gtc	cag	gag	cgc	acc	atc	ttc	ttc	aag	gac	gac	ggc	aac	tac	aag	9201	
		Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys		
					360					365					370				
45		acc	cgc	gcc	gag	gtg	aag	ttc	gag	ggc	gac	acc	ctg	gtg	aac	cgc	atc	9249	
		Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile		
				375				380						385					
50		gag	ctg	aag	ggc	atc	gac	ttc	aag	gag	gac	ggc	aac	atc	ctg	ggg	cac	9297	
		Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His		
			390					395					400						
55		aag	ctg	gag	tac	aac	tac	aac	agc	cac	aac	gtc	tat	atc	atg	gcc	gac	9345	
		Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp		
		405				410						415				420			
60		aag	cag	aag	aac	ggc	atc	aag	gtg	aac	ttc	aag	atc	cgc	cac	aac	atc	9393	
		Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile		
					425						430					435			

gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc 9441
 Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro
 440 445 450

5 atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc 9489
 Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr
 455 460 465

10 cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc 9537
 Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val
 470 475 480

15 ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag 9585
 Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu
 485 490 495 500

ctg tac aag taa agc 9600
 Leu Tyr Lys

20

<210> 10
 <211> 503
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP

30 <400> 10
 Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val
 1 5 10 15

35 Arg Ala Met Glu Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala
 20 25 30

Leu Ser Val Phe Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met
 35 40 45

40 Ala Asn Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe
 50 55 60

45 Leu Ala Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr
 65 70 75 80

Gly Thr Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu
 85 90 95

50 Ala Gln Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met
 100 105 110

Gly Ile Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg
 115 120 125

55 Gly Pro Ser Pro Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile
 130 135 140

60 Pro Asp Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser
 145 150 155 160

	Arg	Leu	Ala	Ser	Glu	Glu	Gln	Ile	Leu	Arg	Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Tyr	
					165					170					175		
5	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Glu	Pro	Pro	Gln	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Val	
				180					185					190			
	Ala	Lys	Val	Tyr	Glu	Ile	Asn	His	Gly	Arg	Gly	Pro	Asn	Gln	Glu	Gln	
			195					200					205				
10	Met	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Met	Glu	Met	Lys	His	Arg	Asn	Pro	
		210					215					220					
	Arg	Arg	Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Asn	Ala	Pro	Thr	Gln	
15	225					230					235					240	
	Arg	Pro	Pro	Gly	Arg	Leu	Gly	Arg	Trp	Ile	Arg	Thr	Val	Ser	Asp	Glu	
					245					250					255		
20	Asp	Leu	Glu	Gly	Ser	Ile	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	
				260					265					270			
	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	
			275					280					285				
25	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	
		290					295					300					
	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	
30	305					310					315					320	
	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	
					325					330					335		
35	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	
				340					345					350			
	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	
			355					360					365				
40	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	
		370					375					380					
	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	
45	385					390					395					400	
	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	
				405					410						415		
50	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	
			420						425					430			
	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	
			435					440					445				
55	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	
		450					455					460					
	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	
60	465					470					475					480	

Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
485 490 495

5 Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
500

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185
2186
2187
2188
2189
2190
2191
2192
2193
2194
2195
2196
2197
2198
2199
2200
2201
2202
2203
2204
2205
2206
2207
2208
2209
2210
2211
2212
2213
2214
2215
2216
2217
2218
2219
2220
2221
2222
2223
222



Small, illegible marks or artifacts on the right edge of the page.

